

Driedimensionale morfologie van de antennale klier bij de *Penaeus vannamei* en de ontwikkeling van een kwantificatiemethode voor de studie van het White spot syndrome virus

De Gryse Gaëtan M.

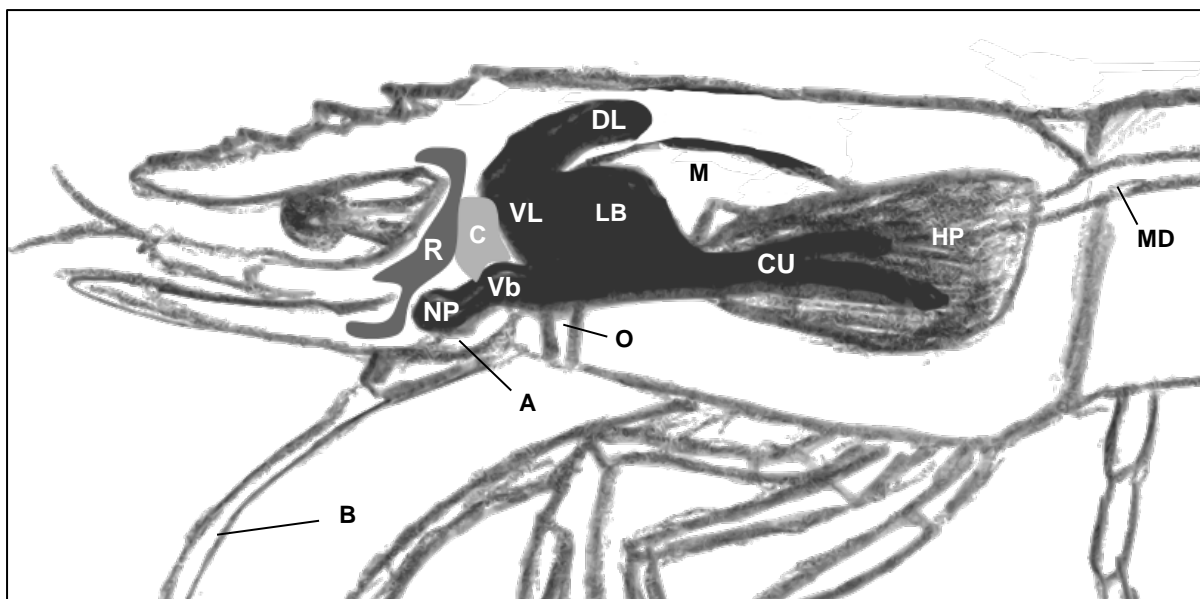
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Strandloperstraat 8, 8400 Oostende, Belgium
E-mail: gaetan.degryse@ugent.be

In 2050 zullen naar schatting 9,6 miljard mensen deze wereld bevolken. Om het dreigende voedseltekort op te vangen, wordt onder meer gerekend op de verdere ontwikkeling van de garnalenaquacultuur. De volledige ontplooiing van deze industrie wordt echter sterk gehinderd door virale uitbraken. Het White spot syndrome virus (WSSV) wordt algemeen aanzien als de grootste bedreiging voor de industrie. Al sinds 1992 confronteert het virus de garnalenaquacultuur met massale productieverliezen. Eén van de grote vraagstukken binnen het onderzoek naar WSSV blijft het identificeren van de intredepoot van het virus. Omdat de buitenkant van de garnaal en zijn kieuwen afgeschermd worden door een virus-impermeabele cuticula, gaan veel onderzoekers ervan uit dat WSSV de garnaal binnentreedt via de (midden)darm. Een aantal studies pleiten echter tegen deze visie.

Zo werd er recent in het laboratorium van de promotor bewezen dat WSSV via perorale weg de garnaal moeilijk kan infecteren. Voor een perorale inoculatie zijn er meer dan 106 infectieuze partikels nodig. Het epitheel van het spijsverteringskanaal wordt afgeschermd van zijn lumen door een cuticulaire aflijning of peritrofe membraan. Beiden zijn niet tot zeer moeilijk penetreerbaar door virussen en daarom werd verondersteld dat deze barrière de oorzaak is van de perorale resistentie. Er zijn slechts twee groepen van organen die in direct contact staan met de buitenwereld, waarvan het lumen niet afgelijnd wordt door een cuticula of andere analoge structuur: (i) de tegumentale klieren en (ii) de antennale klieren. Beide organen zijn betrokken in de pathogenese van WSSV, maar enkel deze laatste is effectief een doelwitorgaan waar replicatie plaatsvindt na intramusculaire inoculatie. De antennale klier kreeg tot nog toe slechts beperkte aandacht van de wetenschappelijke gemeenschap. Zelfs een degelijke basis omtrent morfologie en anatomie ontbreekt. Omdat het belangrijk zal zijn om ook dit orgaan te betrekken bij toekomstige pathogenesestudies, werd in deze thesis de structuur van de antennale klier in kaart gebracht.

Vertrekkende vanuit seriële histologische coupes van *Penaeus vannamei*, werd er met behulp van 3D-reconstructiesoftware (AMIRA v5.6) een onverwacht complexe organisatie van de antennale klier bij de *Penaeus vannamei* gevonden (Figuur 1). De cellulaire structuur en opbouw vertonen veel overeenkomsten met het urinaire stelsel van vertebraten. Het orgaan bestaat uit twee bilaterale, compacte glandulaire gedeeltes (Figuur 1, C), gelegen ter hoogte van de overgang van de cephalothorax naar de antennale coxipodiet (eerste segment van het antennale aanhangsel). Dit gedeelte lijkt sterk op de nier van vertebraten. Centraal in het compacte glandulaire gedeelte ligt de coelomosac. Deze is opgebouwd uit één cellaag van podocyten met grote en onregelmatige kernen, en staat in voor de primaire filtratie van de hemolymfe. Het perifere gedeelte wordt ingenomen door het labrynt dat bestaat uit anastomoserende tubuli van unicellulair, afgeplat epitheel. Hier vindt de secundaire modificatie van het filtraat plaats.

Vanuit dit compacte glandulaire gedeelte vertrekken twee structuren die beiden een verderzetting zijn van het labrynt. De anastomoserende tubuli van het labrynt lopen verder naar rostraal, waar ze zich over de gehele lichaamsholte spreiden (Figuur 1, R). Zo gaan ze ondermeer de hersenen volledig omgeven. De tubuli van beide helften versmelten ter hoogte van deze rostrale structuur met elkaar. De cellulaire structuur van dit gedeelte lijkt zeer sterk op die van het labrynt.



Figuur 1. Schematische opbouw en situering van de antennale klier in de *Penaeus vannamei*, A) antennale coxipodiet B) antenne, O) oesofagus, M) maag, MD) middendarm, HP) hepatopancaas, NP) nefroporie, C) compacte glandulaire deel, R) rostrale structuur, Vb) ventrale blaas, LB) laterale blad, CU) caudale uitlopers van het laterale blad, VL) ventrale lobus van de mediane blaas, DL) dorsale lobus van de mediane blaas.

Een tweede verderzetting van het labyrint is de bilaterale ventrale blaas (met glad spierweefsel in de wand), die uitmondt in de nefroporiën (Figuur 1, Vb & NP). Dit zijn de externe openingen van de antennale klier, bilateraal gelegen ter hoogte van de antennale coxipodieten (Figuur 1, A). Scanning-elektronenmicroscopische opnamen werden genomen om de externe conformatie van deze openingen te onthullen. Ze zijn gesitueerd op een komvormige depressie (caudaalwaarts gericht) op een mediale antennale coxipodiet protuberantie. De opening zelf is een halvemaanvormige spleet. Beide helften van de depressie overlappen elkaar en gaan zo de nefroporie elastisch afsluiten. Het is goed denkbaar dat dit gedeelte van het exoskelet minder elastisch is na de ecdysis (verveling), waardoor de nefroporie minder goed wordt afgesloten. Hierdoor bestaat de mogelijkheid voor omgevingswater om in en uit de antennale klier te sijpelen. Als de antennale klier inderdaad de intredepoot is, kan dit een verklaring zijn waarom garnalen na ecdysis gevoeliger zijn voor WSSV-infectie.

Naast de ventrale blaas en de rostrale structuur is er ook een derde, caudaalwaartse uitstulping van de antennale klier. Deze vertrekt echter niet uit het compacte glandulaire deel, zoals de twee eerder genoemde structuren, maar wel uit een caudaalwaartse uitloper van de ventrale blaas. De caudale uitzetting bestaat uit twee grote (bi)laterale bladen die het spijsverteringskanaal flankeren en uiteindelijk uitlopen tot en met de voorste helft van de hepatopancaas (Figuur 1, LB & CU). Op verschillende plaatsen van deze structuur versmelten beide helften met elkaar, zodat men eigenlijk van één antennale klier of een antennaal complex kan spreken (in plaats van twee aparte bilaterale structuren). De meest opvallende versmelting wordt gevormd door de mediane blaas die de voordarm (maag) rostraal bedekt met een ventrale lobus en dorsaal met een dorsale lobus (Figuur 1, VL & DL). Dit gedeelte van de klier is over de volledige lengte slechts één cellaag dik, met uitzondering van wat glad spierweefsel rond de dorsale lobus en een dunne laag tussen de maag en de mediale zijde van de laterale bladen.

Voor de aanvang van deze thesis werd slechts de compacte glandulaire structuur en de ventrale blaas beschreven. Er bestonden enkel vermoedens rond blaasvormige uitstulpingen in de cephalothorax, vertakkingen tot aan de hersenen en een verbinding tussen beide klierhelften. Deze thesis geeft voor het eerst de gedetailleerde structuur van de gehele antennale klier en toont dat deze klier in beide richtingen veel verder reikt dan algemeen werd aangenomen. De afwezigheid van een cuticula, de cellulaire structuur (één tot twee cellagen dik) en de sterke verspreiding van de antennale klier doorheen de cephalothorax (zoals blijkt uit het 3D-model), versterken de hypothese rond de antennale klier als WSSV-intredepoot. Een enkele cellaag is snel gepenetreerd en door de uitgebreidheid van het orgaan in de cephalothorax, kan het virus snel doorheen de cephalothorax spreiden, zonder daarbij gehinderd te worden door de immuunresponsen gepaard met een hemolymfe-geassocieerde virusspreiding. Dit zou kunnen verklaren hoe WSSV zo snel en efficiënt al zijn doelwitorganen kan bereiken. Het orgaan ligt namelijk naast en tegen de hepatopancaas, spieren, zenuwen, hersenen, subcuticulaire (epi)dermis, lymfoïde organen, kieuwen en het spijsverteringskanaal.

Tijdens de 3D-reconstructie van de klier werd ook speciale aandacht besteed aan eventueel geassocieerde structuren. Dit resulteerde in de ontdekking dat heel wat eerder beschreven spieren van

de cephalothorax sterk geassocieerd zijn met de klier. Omwille van deze reden werden ook de relevante spieren gereconstrueerd in 3D. Dit leidde (samen met de volledige structuur van de klier) tot het uitwerken van enkele opvallende hypothesen zoals een mogelijke rol van de klier in mechanische reiniging van de kieuwkamer en/of het dynamische vervellingsproces van de garnaal, wat niet alleen interessant is vanuit biologisch standpunt, maar ook vanuit een microbiologische hoek. Indien de antennale klier effectief een rol speelt in het reinigen van de kieuwkamer, zou het interessant zijn om de urine van garnalen te onderzoeken op antibacteriële activiteit. Dat de antennale klier in verband wordt gebracht met het vervellingsmechanisme is een potentieel zeer belangrijk gegeven. Het is immers aangetoond dat garnalen significant gevoeliger zijn voor WSSV-infectie tijdens of onmiddellijk na het moment van vervellen. Daarenboven werd eerder al aangehaald (zie boven) dat de nieuwe cuticula een minder goede afsluiting van de nefroporiën zou kunnen verzorgen.

Om de rol van de antennale klier verder uit te klaren, werd ook een poging ondernomen om de *in vivo* dynamiek van de antennale klier te bestuderen tijdens de ecdysis door het orgaan *in vivo* aan te kleuren. Monitoring met een high speed camera zou dan de evolutie van dit orgaan tijdens het vervellingsproces kunnen vastleggen (de *Penaeus vannamei* is, net als vele andere garnalensoorten, transparant). Geen enkele kleurstof bleek echter lang genoeg *in situ* aanwezig te blijven om het experiment te laten doorgaan.

Voor het bestuderen van de WSSV-pathogenese, werd er ook een kwantitatieve polymerase-kettingreactie (qPCR)-methode ontwikkeld. De primers werden ontworpen met behulp van bio-informaticasoftware zoals MEGA, Primer3Plus en OligoAnalyzer. Drie WSSV-genen werden genomineerd als potentiële doelwitsequentie voor de ontwikkeling van een primerpaar, geschikt voor qPCR: (i) het DNA-polymerasegen (ii), het VP28-gen en (iii) het VP19-gen. Enkel voor deze laatste sequentie kon een geschikt primerpaar gevonden worden dat voldoet aan de stringente vereisten, nodig voor een efficiënte qPCR. Met behulp van de ontwikkelde primers werd eerst standaard-DNA aangemaakt uit de WSSV-stock. Vervolgens werden de optimale qPCR-reactiecondities experimenteel bepaald (50 nM forward primer, 200 nM reverse primer en een annealingtemperatuur van 58 °C). Het ontwikkelde qPCR-protocol is theoretisch in staat om met 98 % efficiëntie, één WSSV-kopij per µl te detecteren met een sterke herhaalbaarheid.

Vermits de antennale klier het excretoire orgaan is, moet het qPCR-protocol in staat zijn om WSSV-DNA te detecteren en kwantificeren in urine. Uit ervaring blijkt dat urine van zoogdieren bepaalde componenten bevat die een inhibitorische invloed kunnen uitoefenen op een qPCR-reactie (zoals ureum, magnesium, glucose, ...). Een RNA-extractiekit van Qiagen (Viral RNA Mini Kit, Californië, VSA) zou volgens de fabrikant beter geschikt zijn om viraal genomisch materiaal (zowel DNA als RNA) te extraheren uit urine van zoogdieren, bedoeld voor verdere (q)PCR-analyse. Hoewel WSSV een dsDNA-virus is, zou de Viral RNA Mini Kit beter geschikt zijn om deze inhibitorische componenten te neutraliseren tijdens het extractieproces in vergelijking met de Qiaamp DNA Mini Kit. Deze thesis weerlegt dit gegeven voor garnalenurine. Er werd aangetoond dat de DNA Mini Kit beter presteert dan de Viral RNA Mini Kit voor qPCR-analyse van DNA, aanwezig in garnalenurine.

Deze thesis legt een belangrijke basis voor toekomstige WSSV-pathogenesestudies. Het ontrafelen van de morfologische en anatomische structuur van de antennale klier, versterkt bovendien de hypothese dat de antennale klier de lang gezochte intredepoot is voor het WSSV. Bovendien werd ook een efficiënte kwantificatiemethode ontwikkeld die toelaat om WSSV-replicatie in het orgaan te bestuderen. Deze bevindingen zullen het onderzoek naar WSSV in een stroomversnelling leiden en finaal bijdragen tot de ontwikkeling van een effectieve WSSV-bestrijding.